

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS ✓
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

33

S1 1 PN="DE 2247832"  
?t 1/7

1/7/1  
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

000944337

WPI Acc No: 1973-21570U/197316

**Alkaline cellulase produced by bacilli n, and n,4 - for use in  
purification of effluent waters**

Patent Assignee: RIKAGAKU KENKYUSHO (RIKA )

Number of Countries: 003 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	/
DE 2247832	A					197316	B
JP 48040992	A					197337	
DE 2247832	B	19740627				197427	
US 3844890	A	19741029				197445	
JP 75028515	B	19750916				197541	

Priority Applications (No Type Date): JP 7176685 A 19710930

Abstract (Basic): DE 2247832 A

Alkaline cellulose is a novel enzyme produced by Bacillus N1 (ATCC 21832) and Bacillus N4 (ATCC 21833) in alkaline media, which is active at pH 5-10 (optimum 8-10), optimum temp. being 40 degrees C. The enzyme has a relatively high temp. resistance (shows some activity after being heated at 70 degrees C for 10 mins.). It is insensitive to heavy metal action.

Derwent Class: D15; D16

International Patent Class (Additional): C07G-007/02; C12D-013/10

51

Int. Cl.:

C 12 d, 13/10

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES

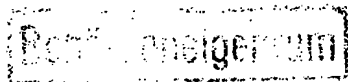


PATENTAMT

52

Deutsche Kl.:

6 a, 22/04



10

11

21

22

49

# Offenlegungsschrift 2 247 832

Aktenzeichen: P 22 47 832.6-41

Anmeldetag: 29. September 1972

Offenlegungstag: 5. April 1973

Ausstellungspriorität: —

50

Unionspriorität

52

Datum: 30. September 1971

53

Land: Japan

51

Aktenzeichen: 76685-71

54

Bezeichnung: Alkalische Cellulase und Verfahren zu ihrer Erzeugung

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: Rikagaku Kenkyusho, Wako, Saitama (Japan)

Vertreter gem. § 16 PatG: Lorenz, E.; Seidler, B.; Seidler, M.; Witt, L., Dr.; Harmsen, J., Dr.;  
Pohl, K.-P.; Rechtsanwälte, 8000 München

72

Als Erfinder benannt: Horikoshi, Koki, Iruma, Saitama;  
Ikeda, Yonosuke; Nakao, Masami; Tokio (Japan)

DT 2247832

ORIGINAL INSPECTED

© 3.73 309 814/1119

16/80

RIKAGAKU KENKYUSHO  
Hirosawa, Wako-shi (Saitama-ken, Japan)

### Alkalische Cellulase und Verfahren zu ihrer Erzeugung

Die Erfindung betrifft eine neue alkalische Cellulase und ein vorteilhaftes Verfahren zu ihrer Erzeugung durch Züchtung eines neuartigen, alkalische Cellulase erzeugenden Mikroorganismus in einem alkalischen Nährmedium, das ein Carbonat enthält.

Das Vorhandensein von Cellulasen ist bisher in bestimmten Arten von Pilzen, Bakterien, Mollusken und höheren Tieren nachgewiesen worden. Von Tieren und Pilzen stammende Cellulasen haben eine optimale Aktivität bei pH-Werten von 5,0-6,0. Von Bakterien der Gattung Pseudomonas oder dergleichen stammende Cellulasen haben eine optimale Aktivität bei einem pH-Wert von etwa 7,0. Hinsichtlich der Hitzebeständigkeit derartigen Cellulasen ist bekannt, daß ihre Aktivität bei einer Temperatur von 60-70° nach zehn Minuten verlorengeht. Es ist ferner bekannt, daß ihre Aktivität durch Schwermetalle allgemein gehemmt wird.

Die Aufgabe der Erfindung besteht nun in der Schaffung einer neuen alkalischen Cellulase, die eine optimale Aktivität in einem pH-Bereich von 5,0-10,0 besitzt, die auch noch eine Aktivität besitzt, nachdem

sie 10 Minuten lang auf 70° C erhitzt worden ist, und deren Aktivität durch Schwermetalle nicht behindert wird.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst, in dem eine neue alkalische Cellulase erzeugende Bakterien der Gattung Bacillus in einem geeigneten Medium gezüchtet und die erzeugte neue alkalische Cellulase aus der Nährbouillon gewonnen wird.

Die neue alkalische Cellulase gemäß der Erfindung hat bei einer Temperatur von 40° C eine optimale Aktivität in einem pH-Bereich von etwa 5-10 und kann dadurch erzeugt werden, daß ein alkalisches Nährmedium, das ein Carbonat enthält, mit Hilfe eines Mikroorganismus vom Stamm Bacillus N<sub>1</sub> oder Stamm Bacillus N<sub>4</sub> vergoren wird.

Der Erfindungsgegenstand wird nachstehend anhand der beigefügten Zeichnungen erläutert. In diesen zeigen

Fig. 1 und 2 elektronenmikroskopische Photographien von im Rahmen der Verwendung zu verwendenden Mikroorganismen vom Stamm Bacillus N<sub>1</sub> bzw. vom Stamm Bacillus N<sub>4</sub>.

Fig. 3 stellt in einem Kurvenbild die Aktivitäten der gemäß der Erfindung erzeugten, alkalischen Cellulasen dar,

Fig. 4 in einem Kurvenbild die Aktivitäten von bekannten Cellulasen,

Fig. 5 in einem Kurvenbild die Aktivitäten der erfindungsgemäßen alkalischen Cellulasen nach einer 10 Minuten langen Behandlung bei 70° C,

Fig. 6 in einem Kurvenbild die Beständigkeit der Aktivität der alkalischen Cellulase gemäß der Erfindung bei verschiedenen pH-Werten,

Fig. 7 in einem Kurvenbild die Temperaturabhängigkeit der Aktivität der alkalischen Cellulase gemäß der Erfindung und

Fig. 8 in einem Kurvenbild die Temperaturbeständigkeit der alkalischen Cellulasen gemäß der Erfindung.

Die im Rahmen der Erfindung verwendeten Mikroorganismen sind neue Arten, die zu der Gattung Bacillus gehören, in dem nachstehend beschriebenen Nährmedium gut wachsen und eine alkalische Cellulase erzeugen. Diese Arten wurden erstmals in den Böden von Hirosawa, Wako-shi (Präfektur Saitama, Japan) entdeckt und aus ihnen isoliert und von der Anmelderin als Stämme Bacillus N<sub>1</sub> und Bacillus N<sub>4</sub> bezeichnet.

Die genannten Mikroorganismen der Stämme Bacillus N<sub>1</sub> und Bacillus N<sub>4</sub> wurden in der nachstehend beschriebenen Weise isoliert.

Der Boden wurde in sterilisiertem Wasser suspendiert und in einer Schale in dem nachstehend angegebenen Nährmedium gezüchtet:

(Zusammensetzung des Nährmediums)

a) Lösliche Stärke	20 g
$K_2HPO_4$	1 g
Hefeextrakt	5 g
Pepton	10 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Agar-Agar	20 g
Wasser	900 ml
b) $Na_2CO_3$	10 g
Wasser	100 ml

a) und b) wurden 15 Minuten lang bei  $115^\circ C$  sterilisiert und dann vermischt.

Die Schale wurde 24-48 Stunden lang bei  $37^\circ C$  bebrütet.

Danach wurde von den auf der Schale vorhandenen Kolonien eine Kolonie eines Mikroorganismus isoliert, welcher die genannte alkalische Cellulase erzeugte.

Dieser Mikroorganismus wurde als "Bacillus  $N_1$ " bezeichnet. Der genannte Bacillus  $N_4$  wurde nach demselben Verfahren isoliert.

Die als Bacillus  $N_1$  und Bacillus  $N_4$  bezeichneten Stämme wurden bei der American Type Culture Collection (ATCC) unter den ATCC-Zugangsnummern 21832 und 21833 deponiert. Diese Depots bei der ATCC unterliegen keiner Beschränkung, so daß die Kulturen für die Öffentlichkeit ohne weiteres zugänglich sind. Beide genannten Stämme wurden am 13. September 1970 für die Abgabe an die Öffentlichkeit freigegeben. Die Erfinder haben entdeckt, daß die Mikroorganismen Bacillus  $N_1$  und Bacillus  $N_4$

unter den nachstehend angegebenen Züchtungsbedingungen eine neue alkalische Cellulase erzeugen und anreichern, und haben ein Verfahren für die Erzeugung der alkalischen Cellulase gemäß der Erfindung geschaffen.

Die Eigenschaften des Bacillus N<sub>1</sub> und des Bacillus N<sub>4</sub> sind nachstehend angegeben. Die mikrobiologischen Eigenschaften wurden nach den Verfahren festgestellt, die in "Aerobic Spore-forming Bacteria" von Nathan R. Smith, R.E. Gordon und F.E. Clerk (United States Department of Agriculture, November 1952) und in "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (1957) beschrieben sind.

Soweit nichts anderes ausdrücklich angegeben ist, wurden Medien mit den nachstehend angegebenen Zusammensetzungen verwendet, wobei jedes Medium durch den Zusatz von 1,0% wasserfreiem Natriumcarbonat auf einen pH-Wert von etwa 10 eingestellt wurde. (Jeder Wert in der Tabelle gibt das Gewicht in g in 1 l Wasser an).



2247832

- 6 -

Art des Nähr- me- diums	Bestandteile						Sonstige
	Na- trium- carbo- nat	Pep- ton	Fleisch- extrakt	Hefe- ex- trakt	Trau- ben- zuck- er	Stär- ke	
A	10	5		5		20	1)
B	10 od. n.z.	5	3				
C	"	5	3				Agar- Agar:15
D	"	5	3				NaCl:70
E	"	5	3		10		
F	"	5	3		10		Agar- Agar:15
G	"	5	3				Gelatine:5
H	"	5					
I	"						
J	10	5		5		20	1)
K	10	7			5		NaCl:5
L	10	5	3				KNO <sub>3</sub> :1
M	10	5		5		20	1)
N	10 od. n.z.						3)
O	10	10	3	2	10		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :5
P	10						4)
Q	10			5	10		5)
R							1)

309814/1119

- A Selektives Medium  
B Bouillon  
C Bouillon mit Agar-Agar  
D NaCl-Bouillon  
E Traubenzucker-Bouillon  
F Traubenzucker-Bouillon mit Agar-Agar  
G Gelatine-Medium  
H Peptonwasser  
I Kartoffelmedium  
J Medium zur Bestimmung der Wachstumsbedingungen  
K Medium für den Voges-Proskauer-Test  
L Medium für den Nitratreduktions-Test  
M Medium für den Stärkehydrolyse-Test  
N Medium für den Citronensäureverwertungs-Test  
O Medium für den anaeroben Wachstums-Test  
P Medium für den Zuckerverwertungs-Test  
Q Medium für den Kaseinzersetzungs-Test  
R Medium für den Katalasereaktions-Test
- 1)  $K_2HPO_4$ : 1  
Agar-Agar: 15  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,2
- 2) Handelsüblicher Kartoffelextrakt (Difco): 50  
Agar-Agar: 15
- 3) NaCl: 1  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,2  
 $(NH_4)_2HPO_4$ : 1  
 $KH_2PO_4$ : 0,5  
Natriumcitrat: 2  
Agar-Agar: 15
- 4)  $(NH_4)_2HPO_4$ : 1  
KCl: 0,2  
 $MgSO_4$ : 0,2  
Hefeextrakt: 0,2  
Zuckerarten: 5

Das Wachstum des Stammes wurde auf einem Medium beobachtet, das 0,5 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 1,0 % Traubenzucker, 0,01 %  $K_2HPO_4$ , 0,002 %  $MgSO_4$ , 1,0 %  $Na_2CO_3$  und 1,5 % Agar-Agar (pH-Wert = 10,0) enthielt. Von diesen Bestandteilen war das  $Na_2CO_3$  zugesetzt worden, nachdem es getrennt sterilisiert worden war.

I) Schalenkultur:

Die Kolonie ist kreisförmig und hat eine ebene Oberfläche. Der Rand der Kolonie ist wellig oder ohrmuschelförmig. Die Kolonie hat eine gelblichbraune, glänzende Oberfläche.

II) Schrägrohrkultur (slant culture):

Sich ausbreitende Kultur mit glänzender Oberfläche.

III) Einstichkultur (stab culture)

Ein Wachstum wird nur an der Oberfläche, nicht in der Tiefe beobachtet.

c) Biologische Eigenschaften:

I) Optimale Wachstumsbedingungen:

pH-Wert	9,0-10,0
Temperatur	30-42° C
aerob	

II) Wachstumsbedingungen:

pH-Wert	8,0-11,0
Temperatur	kein Wachstum bei 45° C (alkalisches Medium)
aerob	

III) Gram-Färbungs-Test: Positiv (in dem vorgenannten selektiven Medium)

- 5) Kasein: 5  
 $K_2HPO_4$ : 1  
 Agar-Agar: 15  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,2  
 n.z. nicht zugesetzt

Die Stämme  $N_1$  und  $N_4$  wurden während ihres Wachstums auf dem vorerwähnten selektiven Medium morphologisch beobachtet.

### 1. Mikrobiologische Eigenschaften des Stammes $N_1$

#### a) Morphologie:

Der Mikroorganismus hat eine Größe von 0,5-0,8  $\mu m$  mal 1,5-2,0  $\mu m$ . Die Spore ist oval und hat eine Größe von 0,8-1,2  $\mu m$  mal 1,8-2,2  $\mu m$ . Das Sporangium ist gequollen. Wie aus der elektronenmikroskopischen Photographie in Fig. 1 erkennbar ist, hat der Mikroorganismen peritrichöse Geißeln, die eine Motilität besitzen.

#### b) Wachstumseigenschaften auf verschiedenen Medien:

Medium		<u>Wachstumszustand</u>	
		beim pH-Wert 7	beim pH-Wert 10
I)	Bouillon	kein Wachstum	gutes Wachstum
II)	Bouillon mit Agar-Agar	kein Wachstum	gutes Wachstum
III)	Traubenzucker-Bouillon	kein Wachstum	sehr gut. Wachstum
IV)	Traubenzucker-Bouillon mit Agar-Agar	kein Wachstum	sehr gut. Wachstum
V)	Gelatine-Medium	kein Wachstum	gutes Wachstum
VI)	Peptonwasser	kein Wachstum	Wachstum
VII)	Kartoffelmedium	kein Wachstum	gutes Wachstum

309814/1119

## b) Wachstumseigenschaften auf verschiedenen Medien:

Medium	Wachstumszustand	
	beim pH-Wert 7	beim pH-Wert 10
I) Bouillon	kein Wachstum	kein Wachstum
II) Bouillon mit Agar-Agar	kein Wachstum	kein Wachstum
III) Traubenzuckerbouillon	kein Wachstum	sehr gutes Wachstum
IV) Traubenzucker-Bouillon mit Agar-Agar	kein Wachstum	sehr gutes Wachstum
V) Gelatine-Medium	kein Wachstum	kein Wachstum
VI) Peptonwasser	kein Wachstum	kein Wachstum
VII) Kartoffelmedium	kein Wachstum	gutes Wachstum

Das Wachstum des Stammes wurde auf einem Medium beobachtet, das 0,5 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 1,0 % Traubenzucker, 0,01 %  $K_2HPO_4$ , 0,002 %  $MgSO_4$ , 1,0 %  $Na_2CO_3$  und 1,5 % Agar-Agar (pH-Wert = 10,0) enthielt. Von diesen Bestandteilen war das  $Na_2CO_3$  zugesetzt worden, nachdem es getrennt sterilisiert worden war.

Die Kolonie hat eine unregelmäßige Form und eine ebene Oberfläche. Der Rand der Kolonie ist wellig oder ohrmuschelförmig. Die Kolonie hat eine gräulich-weiße, glänzende Oberfläche.

## II) Schrägrohrkultur (slant culture):

Sich ausbreitende Kultur mit glänzender Oberfläche.

## III) Einstichkultur (stab culture)

Ein Wachstum wird nur an der Oberfläche, nicht in der Tiefe beobachtet.

- IV) Voges-Proskauer-Reaktion: Positiv
- V) Nitratreduktion: Positiv
- VI) Katalasereaktion: Positiv
- VII) Gelatineverflüssigung: Sehr schwach
- VIII) Stärkehydrolyse: Positiv
- IX) Citronensaures Agar-Agar-Medium (alkalisch): Sehr schlechtes Wachstum
- X) Unter anaeroben Bedingungen: Kein Wachstum
- XI) Bouillon mit 7 % Kochsalz: Gutes Wachstum unter alkalischen Bedingungen (Bildung von Niederschlägen) aber kein Wachstum im neutralen Medium
- XII) Bildung von Sporen auf Bouillon mit Agar-Agar: Es bilden sich kaum Sporen und wachsen höchstens sehr langsam.
- XIII) Zersetzung von Kasein: Sehr schwach
- d) Verwertung von Kohlenstoffquellen:

Der Stamm N<sub>1</sub> wächst nicht im neutralen Medium. Im alkalischen Medium wächst er, aber die Erzeugung von Säure kann nicht bestimmt werden, weil das Medium 1 % Carbonat enthält. Im alkalischen Medium kann der Stamm Galaktose, Raffinose, Sorbit oder Glycerin nicht verwerten.

## 2) Mikrobiologische Eigenschaften des Stammes N<sub>4</sub>

### a) Morphologie:

Der Mikroorganismus hat eine Größe von 0,1-0,2 µm mal 4,0-6,0 µm. Die Spore ist kreisförmig und hat eine Größe von 1,5-2,0 µm mal 1,5-2,0 µm. Die Sporozyste ist gequollen. Wie aus der elektronenmikroskopischen Photographie in Fig. 2 hervorgeht, hat der wachsende Mikroorganismus peritrichöse Geißeln mit Motilität.

Diese mikrobiologischen Eigenschaften der Stämme N<sub>1</sub> und N<sub>4</sub> sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt, aus der deutlich hervorgeht, daß diese Stämme verschiedene mikrobiologische Eigenschaften haben und zu verschiedenen Arten gehören.

Eigen- schaft	Stamm N <sub>1</sub>	Stamm N <sub>4</sub>
I	0,5-0,8 µm mal 1,5-2,0 µm	0,1-0,2 µm mal 4,0-6,0 µm
II	0,8-1,2 µm mal 1,8-2,2 µm	1,5-2,0 µm mal 1,5-2,0 µm
III	kreisförmig, ebenflächig, gelblichbraun, glänzend	lichtundurchlässig, ebenflächig, gräulichweiß, glänzend
IV	ausgedehnte, stoffartige Form, glänzend	ausgedehnte, stoffartige Form, glänzend
V	Wachstum	kein Wachstum
VI	hydrolysierend	hydrolysierend
VII	sehr schwach	sehr schwach
VIII	sehr schwach	sehr schwach
IX	Bildung von Niederschlägen	Trübung
X	keine Verwertung von Galaktose, Raffinose, Sorbit oder Glycerin	keine Verwertung von Inositol, Sorbit oder Glycerin
	Dabei ist	
I:	Größe des Bakteriums	
II:	Größe der Spore	
III:	Beschreibung der Schalenkultur	
IV:	Beschreibung der Schrägrohrkultur	
V:	Wachstum auf Bouillon mit Agar-Agar	
VI:	Stärkehydrolyse	
VII:	Gelatineverflüssigung	
VIII:	Kaseinhydrolyse	

## c) Biologische Eigenschaften:

## I) Optimale Wachstumsbedingungen:

pH-Wert 9,0-10,0  
Temperatur 30-42° C  
aerob

## II) Wachstumsbedingungen:

pH-Wert 8,0-11,0  
aerob

III) Gram-Färbungs-Test: Positiv (in dem vorgenannten selektiven Medium)

IV) Voges-Proskauer-Reaktion: Positiv

V) Nitratreduktion: Positiv

VI) Katalasereaktion: Positiv

VII) Gelatineverflüssigung: Sehr schwach

VIII) Stärkehydrolyse: Positiv

IX) Citronensaures Agar-Agar-Medium (alkalisch):  
Sehr schlechtes Wachstum

X) Unter anaeroben Bedingungen: Kein Wachstum

XI) Bouillon mit 7 % Kochsalz: Gutes Wachstum unter alkalischen Bedingungen (Trübung) aber kein Wachstum im neutralen Medium

XII) Bildung von Sporen auf Bouillon mit Agar-Agar:  
Es bilden sich kaum Sporen.

XIII) Zersetzung von Kasein: sehr schwach.

## d) Verwertung von Kohlenstoffquellen:

Der Stamm N<sub>4</sub> wächst nicht im neutralen Medium. Im alkalischen Medium wächst er, aber die Erzeugung von Säure kann nicht bestimmt werden, weil das Medium 1 % Carbonat enthält. Im alkalischen Medium kann der Stamm Inositol, Sorbit oder Glycerin nicht verwerten.



und hat eine positive Voges-Proskauer-Reaktion. Dagegen kann der *Bacillus pasteurii* Stärke nicht hydrolysieren und hat er eine negative Voges-Proskauer-Reaktion. Ein charakteristischerer Unterschied besteht zwischen den ein Wachstum ermöglichenden pH-Werten. Im allgemeinen wachsen Bakterien der Gattung *Bacillus* bei pH-Werten von etwa 5,0-9,0. Der *Bacillus polymyxa* wächst bei pH-Werten von 4,8-7,2, der *Bacillus alvei* bei pH-Werten von 4,8-5,6 und der *Bacillus pasteurii* bei pH-Werten bis zu 8,6 unter anaeroben Bedingungen. Dagegen wachsen die Stämme  $N_1$  und  $N_4$  bei pH-Werten von etwa 8,0 bis 11,0. Man erkennt somit, daß die Stämme  $N_1$  und  $N_4$  von den vorerwähnten, bekannten, ähnlichen Arten gut unterschieden werden können.

Wie vorstehend beschrieben wurde, ist keine Art bekannt, die mit dem Stamm  $N_1$  oder dem Stamm  $N_4$  identisch ist. Angesichts von charakteristischen mikrobiologischen Eigenschaften kann man annehmen, daß es sich um neue Arten handelt.

Die Stämme  $N_1$  und  $N_4$  wurden daher als Stämme  $N_1$  bzw.  $N_4$  der Gattung *Bacillus* bezeichnet.

Jeder der Stämme  $N_1$  und  $N_4$  kann in einer Nährbouillon eine alkalische Cellulase erzeugen und in hoher Konzentration anreichern. Beim Züchten dieser Stämme verwendet man als Kohlenstoffquellen vorzugsweise verschiedene Zuckersubstanzen, beispielsweise Traubenzucker, Saccharose, CMC, Kleie, Cellulosepulver usw. und als Stickstoffquellen Pepton, Fleischextrakt, Maisquellwasser, entfettete Sojabohnen usw. Man kann auch anorganische Substanzen verwenden, beispielsweise Ammoniumsalze, Phosphate und Nitrate.

- IX: Zustand beim Wachstum auf Bouillon mit 7 % Kochsalz
- X: bei der obersten Temperatur, bei der ein Wachstum beobachtet werden kann.

Aufgrund dieser Eigenschaften wurden die Stämme  $N_1$  und  $N_4$  nach den Klassifikationsmethoden untersucht, die in den vorgenannten Veröffentlichungen angegeben sind. Dies sind: N.R. Smith u.a., "Aerobic Spore-forming Bacteria" und "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957)", S. 613 ff. Dabei wurde festgestellt, daß jeder Stamm in manchen Punkten bekannten Bakterien der Gattung *Bacillus* ähnlich ist, daß sich aber jeder der Stämme  $N_1$  und  $N_4$  in charakteristischen Eigenschaften von diesen bekannten Bakterien unterscheidet. Da unter den bekannten Bakterien kein Stamm gefunden werden konnte, der dieselben mikrobiologischen Eigenschaften besitzt wie der Stamm  $N_1$  oder  $N_4$ , kann man diese Stämme als neue Arten der Gattung *Bacillus* bezeichnen.

Da jeder der Stämme  $N_1$  und  $N_4$  ein aerobes sporenbildendes Bakterium darstellt, gehören beide Stämme zu der Gattung *Bacillus*. Für die Stämme  $N_1$  und  $N_4$  ist es charakteristisch, daß sie nur in einem alkalischen, aber nicht in einem neutralen Medium wachsen.

Zur Bestimmung der Stämme  $N_1$  und  $N_4$  wurden bekannte Stämme untersucht. Dabei hat es sich gezeigt, daß der Stamm  $N_1$  dem *Bacillus polymyxa* und dem *Bacillus alvei* ähnelt und daß der Stamm  $N_4$  dem *Bacillus pasteurii* ähnelt. Jedoch wächst der Stamm  $N_1$  in einem 7 % Kochsalz enthaltenden Medium, während der *Bacillus polymyxa* und der *Bacillus alvei* in einem 5 % Kochsalz enthaltenden Medium nicht wachsen. Der Stamm  $N_4$  hydrolysiert Stärke

Die Aktivität der erfindungsgemäß erzeugten alkalischen Cellulasenormalsubstanz wird wie folgt bestimmt:

Verfahren zur Aktivitätsbestimmung und Aktivitätseinheit

0,5 ml einer Enzymflüssigkeit werden zu 1 ml CMC (2,0 %) und 1 ml einer Glycin- NaCl-NaOH- Pufferlösung (pH-Wert 9,0) zugesetzt. Die Reaktion wird 20 Minuten lang bei 40° C durchgeführt.

Nach der Durchführung der Reaktion wird mit Hilfe der 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) der reduzierte Zucker bestimmt. Dazu wird 1 ml des DNS-Reagens zu 0,25 ml der Reaktionsflüssigkeit zugesetzt und das Gemisch zur Färbung 5 Minuten lang auf 100° C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Flüssigkeit mit 4 ml destilliertem Wasser verdünnt. Danach wird das Absorptionsvermögen bei 500 nm bestimmt.

Die Aktivitätseinheit des Enzyms wird wie folgt bestimmt: Wenn unter den vorgenannten Bedingungen reduzierter Zucker in einer 1 mg Traubenzucker entsprechenden Menge gebildet wird, beträgt die Aktivität 100 Einheiten.

Die alkalische Cellulase gemäß der Erfindung hat eine relative Aktivität von 200-1000 Einheiten pro g, und es kann nachgewiesen werden, daß sie ein neues Enzym mit neuartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften ist, die nachstehend angegeben sind.

Bessere Ergebnisse erzielt man bei Mitverwendung von winzigen Mengen von anorganischen Metallsalzen, Vitaminen, wachstumsfördernden Faktoren, wie Hefeextrakt usw. Um den pH-Wert einer Nährbouillon etwa bei 10 zu halten, setzt man zweckmäßig 0,5-1,5 % wasserfreies Natriumcarbonat zu.

Vorzugsweise erfolgt die Züchtung bei einer Temperatur von etwa 20-40° C unter Schütteln oder Bewegung durch durchperlende Luft. Die Erzeugung der gewünschten alkalischen Cellulase erreicht während etwa 2-6 Tagen ihr Maximum. Man kann eine Rohenzymflüssigkeit gewinnen, indem man die Nährbouillon zentrifugiert, mit Hilfe eines Filterhilfsstoffs filtriert oder Filzkörper und ein Salz, wie Calciumacetat, einer Mischfällung unterwirft.

Man kann diese Rohenzymflüssigkeit als solche verwenden oder ein gereinigtes Enzym gewinnen, indem die Rohenzymflüssigkeit einem bekannten Isolierverfahren unterworfen wird, z.B. einem Aussalzen mit Ammoniumsulfat, einem Ausfällen in einem Lösungsmittel oder einer Dialyse, wobei festes Rohenzym gewonnen wird, das danach gereinigt und kristallisiert wird.

Die beiden aus der Nährbouillon des Stammes N<sub>1</sub> und des Stammes N<sub>4</sub> gewonnenen alkalischen Cellulase-Normalsubstanzen haben gemäß Fig. 3 eine optimale Aktivität im pH-Bereich von etwa 8-10. Diese Aktivität ist für diese alkalische Cellulase charakteristisch, weil bekannte von Mikroorganismen (*Asp. niger*, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. und *Pseudomonas* sp.) stammende Mikroorganismen eine optimale Aktivität im pH-Bereich von etwa 4-7 haben, wie aus der Fig. 4 hervorgeht.

pH-Wert 9,0 die Inaktivierungsbedingungen bestimmt. Die Ergebnisse dieses Versuchs gehen aus der Fig. 7 hervor. Die Inaktivierung begann bei folgender Temperatur.

	Mikroorganismus	
	Stamm N <sub>1</sub>	Stamm N <sub>4</sub>
Temperaturbeständig bis	50° C	60° C

#### (5) Hemmung, Aktivierung und Stabilisierung

Für die von dem Stamm N<sub>1</sub> und dem Stamm N<sub>4</sub> erzeugten, alkalischen Cellulasen wurden die hemmenden oder aktivierenden Einflüsse von Metallionen und erhöhten Temperaturen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind nachstehend angegeben. Jedes Metallion wurde in einer Konzentration von  $10^{-2}$  M verwendet.

Fig. 8 zeigt in einem Kurvenbild die Temperaturbeständigkeit, ausgedrückt durch die bei einem pH-Wert von 9,0 gemessene Restaktivität, die nach einer 10 Minuten dauernden Inaktivierung bei der angegebenen Temperatur vorhanden war. Dabei ist in dem Kurvenbild der Bereich angegeben, in dem die Restaktivität höher ist als 50 %, wenn als 100 % die Maximalaktivität der jeweiligen alkalischen Cellulase bezeichnet wird.

Wie aus der nachstehenden Tabelle hervorgeht, wurde beim Zusatz von Äthylendiamintetraacetat (EDTA) oder von p-Chloromercuribenzoessäure (PCMB) zu den alkalischen Cellulasen keinerlei Hemmung festgestellt.

Wie aus der vorstehenden Tabelle hervorgeht, haben die von dem Stamm  $N_1$  und dem Stamm  $N_4$  erzeugten, alkalischen Cellulasen eine Aktivität in dem pH-Bereich von etwa 7-10 bzw. etwa 5-10.

### (3) pH-Beständigkeit

Die aus Nährbouillons des Stammes  $N_1$  und des Stammes  $N_4$  gewonnenen, alkalischen Cellulasen wurden durch 10 Minuten langes Erhitzen auf  $60^\circ$  inaktiviert. Danach wurde die Restaktivität bestimmt. Aus der nachstehenden Tabelle und der Fig. 6 geht hervor, in welchen pH-Bereichen diese Cellulasen beständig sind.

	Mikroorganismus	
	Stamm $N_1$	Stamm $N_4$
pH-Bereich	6,5-11,0	5,5-11,0

Aus der Fig. 6 geht hervor, in welchen pH-Bereichen die Restaktivität höher ist als 50 %, wenn man mit 100 % die Maximalaktivität der jeweiligen alkalischen Cellulase bezeichnet, die aus einer Nährbouillon des Stammes  $N_1$  oder  $N_4$  gewonnen wurde.

Aus der vorstehenden Tabelle geht hervor, daß sich die von dem Stamm  $N_1$  und dem Stamm  $N_4$  stammenden, alkalischen Cellulasen dadurch kennzeichnen, daß sie in einem großen pH-Bereich beständig sind.

### (4) Inaktivierungsbedingungen (Temperaturbeständigkeit)

Für alkalische Cellulasen, die aus Nährbouillons des Stammes  $N_1$  und des Stammes  $N_4$  gewonnen worden waren, wurden durch Veränderung der Temperatur bei dem

Physikalische und chemische Eigenschaften des Enzyms

## (1) Funktion und Substrateigenschaften:

Die durch Züchtung des Stammes N<sub>1</sub> und des Stammes N<sub>4</sub> erzeugten, alkalischen Cellulasen haben eine spezifische zersetzende Wirkung auf folgende Cellulosen.

Zur Erzeugung der alkalischen Cellulase verwendeter Mikroorganismus

	Stamm N <sub>1</sub>	Stamm N <sub>4</sub>
Zersetzte Substanzen	CMC Cellulose	CMC Cellulose

## (2) Optimaler pH-Bereich:

Mit Hilfe der McIlvaineschen Pufferlösung und der Glycin-Pufferlösung wurden pH-Werte in den Bereichen von 3-8 bzw. 8-11 eingestellt.

Die optimalen pH-Werte jeder aus Nährbouillons des Stammes N<sub>1</sub> und des Stammes N<sub>4</sub> erzeugten, alkalischen Cellulase wurden für das Rohenzym (Fig. 3) und nach einer 10 Minuten dauernden Erhitzung auf 70° C (Fig. 5) bestimmt.

	<u>Optimaler pH-Wert</u>	
	<u>Mikroorganismus</u>	
	Stamm N <sub>1</sub>	Stamm N <sub>4</sub>
Rohenzym	8-9	6
Nach 10 min. bei 70° C	-	10,0

Wirksamkeit im Gebrauch:

Das Enzym bzw. die alkalische Cellulase gemäß der Erfindung ist ein cellulosezersetzendes Enzym, das eine optimale Aktivität in einem pH-Bereich auf der alkalischen Seite besitzt und bei Verwendung zur Abwasserreinigung eine enzymatische Wirksamkeit zeigt.

Die enzymatische Wirksamkeit des Enzyms bzw. der alkalischen Cellulase gemäß der Erfindung wird nachstehend anhand von Versuchsergebnissen erläutert.

## 1) Verwendung:

Bei Verwendung zur Abwasserreinigung kann das Enzym gemäß der Erfindung in Pulverform direkt dem Abwasser zugesetzt werden. Dabei ist keine Begrenzung, z.B. hinsichtlich des pH-Wertes des Abwassers, zu beachten.

## 2) Enzymatische Wirksamkeit in Detergentien:

Das erfindungsgemäße Enzym wurde im Abwasser während einer bestimmten Zeit auf 40° C gehalten und die Zersetzung der Cellulose gemessen.

Versuchsverfahren:

1 g mit Alkali behandelter Cellulose (Avicel SP) und 100 ml des Enzyms mit 3000 Einheiten pro 100 ml wurden während eines Zeitraums von 24 Stunden bei 37° C unter Rühren umgesetzt.

Außerdem wurde der pH-Wert des verwendeten Enzyms während der Reaktionszeit mit Hilfe einer Glycin-NaCl-NaOH-Pufferlösung auf 10,0 eingestellt.



Von der Nährbouillon des Stammes N<sub>4</sub> werden die Bakterienzellen abzentrifugiert. Danach wird die Bouillon auf DEAE-Sephadex (erzeugt von der Firma Pharmacia in Schweden) adsorbiert, das mit einer Pufferlösung von 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, die mit Essigsäure auf den pH-Wert 9,0 eingestellt worden war, dem pH-Wert der Lösung genügend angeglichen worden war. Nach genügendem Waschen der vorstehenden Pufferlösung wurde mit dieser der 0,5 M NaCl zugesetzt worden war, eluiert. Das Eluat wurde einer Gelfiltration mit Sephadex G-100 (erzeugt von der Firma Pharmacia, Schweden) unterworfen, dessen pH-Wert mit Hilfe einer Pufferlösung (pH-Wert 8) von 0,1 M tris-HCl genügend angeglichen worden war.

Man erhält auf diese Weise eine End-Normalsubstanz.

(8) Elementaranalyse:

Aufgrund der mit Sephadex G-100 durchgeführten Gelfiltration wird angenommen, daß die von dem Stamm N<sub>1</sub> und dem Stamm N<sub>4</sub> erzeugten, alkalischen Cellulasen ein Molekulargewicht von etwa  $3 \cdot 10^4$  haben. Bei Enzymen mit hohen Molekulargewichten kann man durch Elementaranalyse und Berechnung der Analysenwerte für Kohlenstoff, Stickstoff, Wasserstoff und Sauerstoff keine charakteristischen Eigenschaften bestimmen. Aus diesem Grunde wurden diese alkalischen Cellulasen keiner Elementaranalyse unterworfen.

Zusammenfassend ergibt der Vergleich der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Enzyms bzw. der alkalischen Cellulase gemäß der Erfindung mit denen der bekannten Cellulasen deutlich, daß es sich um eine neue, von allen bekannten Cellulasen verschiedene alkalische Cellulase handelt.

	<u>Mikroorganismus</u>	
	<u>Stamm N<sub>1</sub></u>	<u>Stamm N<sub>4</sub></u>
Hemmende Metallionen	Cd <sup>++</sup> , Hg <sup>+</sup> , Pb <sup>++</sup> , Cu <sup>++</sup>	Pb <sup>++</sup>
Aktivierende Metallionen	Ka <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>++</sup> , Mn <sup>++</sup> , Fe <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup> , Mn <sup>++</sup>
Temperaturbeständig- bis	70° C	70° C
Hemmung durch EDTA	nicht beobachtet	nicht beobachtet
Hemmung durch PCMB	nicht beobachtet	nicht beobachtet

## (6) Molekulargewicht:

Aufgrund der Bestimmung durch das Gelfiltrationsverfahren unter Verwendung von "Sephadex G-100" nimmt man an, daß die von dem Stamm N<sub>1</sub> und dem Stamm N<sub>4</sub> erzeugten, alkalischen Cellulasen folgende Molekulargewichte haben:

	<u>Verwendeter Stamm</u>	
	<u>N<sub>1</sub></u>	<u>N<sub>4</sub></u>
Molekulargewicht	etwa 3.10 <sup>4</sup>	etwa 3.10 <sup>4</sup> und etwa 1,5.10 <sup>4</sup>

## (7) Verfahren zur Reinigung des Enzyms:

Nachstehend wird die Reinigung beispielsweise des von dem Stamm N<sub>4</sub> erzeugten Enzyms erläutert.



## Patentansprüche:

① Alkalische Cellulase, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Enzym ist, das bei einer Temperatur von 40° eine optimale Aktivität bei einem pH-Wert von 5-10 hat.

2. Verfahren zum Erzeugen der neuen alkalischen Cellulase mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Nährmedium, das aus einem Carbonat, einer Kohlenstoffquelle, einer Stickstoffquelle und einem anorganischen Material mit einem Mikroorganismus von dem Stamm Bacillus N<sub>1</sub> (ATCC 21832) und Bacillus K<sub>4</sub> (ATCC 21833) geimpft und der Mikroorganismus in dem Nährmedium bei Temperaturen von etwa 20-40° C gezüchtet wird, bis in dem Nährmedium eine beträchtliche enzymatische Wirksamkeit vorhanden ist und die genannte alkalische Cellulase in dem Nährmedium erzeugt wird, worauf die genannte alkalische Cellulase aus dem Nährmedium gewonnen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Züchtung in einer aeroben Submerskultur unter Rühren erfolgt.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Züchtung während eines Zeitraums von etwa 24-75 Stunden erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Nährmedium einen pH-Wert von 8-11 hat.

Beispiel 2

Ein Nährmedium mit derselben Zusammensetzung wie das im Beispiel 1 verwendete wurde mit dem Stamm Bacillus N<sub>4</sub> (ATCC 21833) geimpft und 72 Stunden lang in einer Schüttelkultur bei 37° C gezüchtet. In der im Beispiel 1 angegebenen Weise wurde das äthanolgetrocknete Pulver erzeugt. Es wurde eine alkalische Cellulase-Normalsubstanz mit einer relativen Aktivität von 1000 Einheiten pro g in einer Menge von 10 g pro l der Nährbouillon erhalten.

Nach durchgeführter Reaktion wurde unlösliche Cellulose abgetrennt und das Trockengewicht der unlöslichen Stoffe bestimmt.

Ergebnisse:

Aktivität des erfindungsgemäßen Enzyms:

Mikro- organismus	Trockengewicht des unlöslichen Substrats (g)	Zersetzter Anteil %
Bacillus N <sub>1</sub>	0,83	17
Bacillus N <sub>4</sub>	0,72	28

Nachstehend wird der Erfindungsgegenstand anhand von Beispielen erläutert.

Beispiel 1

Ein Nährmedium (pH-Wert etwa 10) mit 1,0 % Pepton, 1,0 % Fleischextrakt, 1,0 % CMC, 0,5 % Natriumchlorid, 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,1 % (getrennt stabilisiertes) wasserfreies Natriumcarbonat enthielt, wurde mit dem Stamm Bacillus N<sub>1</sub> (ATCC 21832) geimpft und 72 Stunden lang in einer Schüttelkultur bei 37° C gezüchtet. Durch Abzentrifugieren der Zellen erhielt man eine Rohenzymflüssigkeit. Diese wurde dann mit Äthanol getrocknet und mit Hilfe eines üblichen Verfahrens pulverisiert. Eine alkalische Cellulase-Normalsubstanz mit einer relativen Aktivität von 330 Einheiten pro g wurde in einer Menge von 16 g pro l der Nährbouillon erhalten.

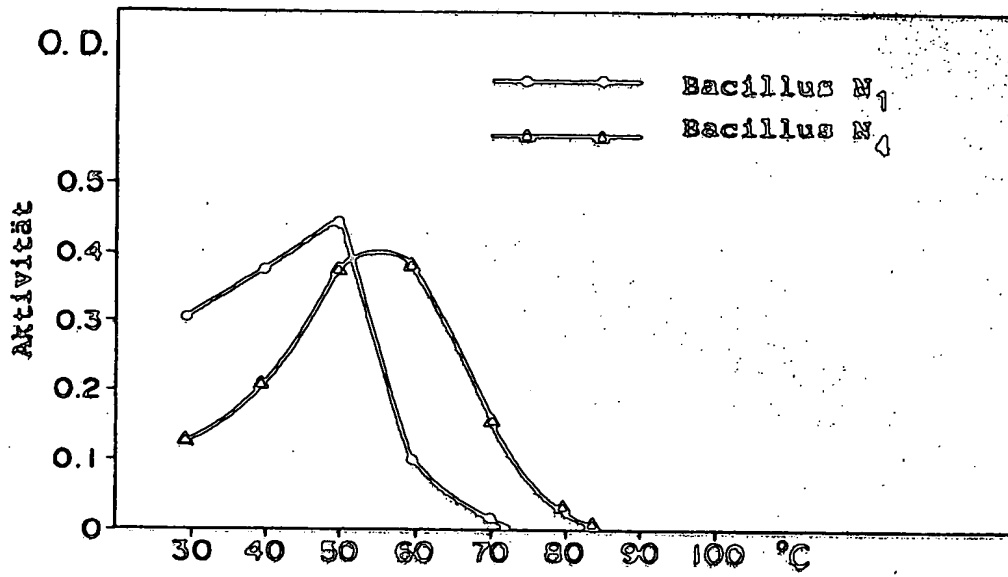


FIG. 7

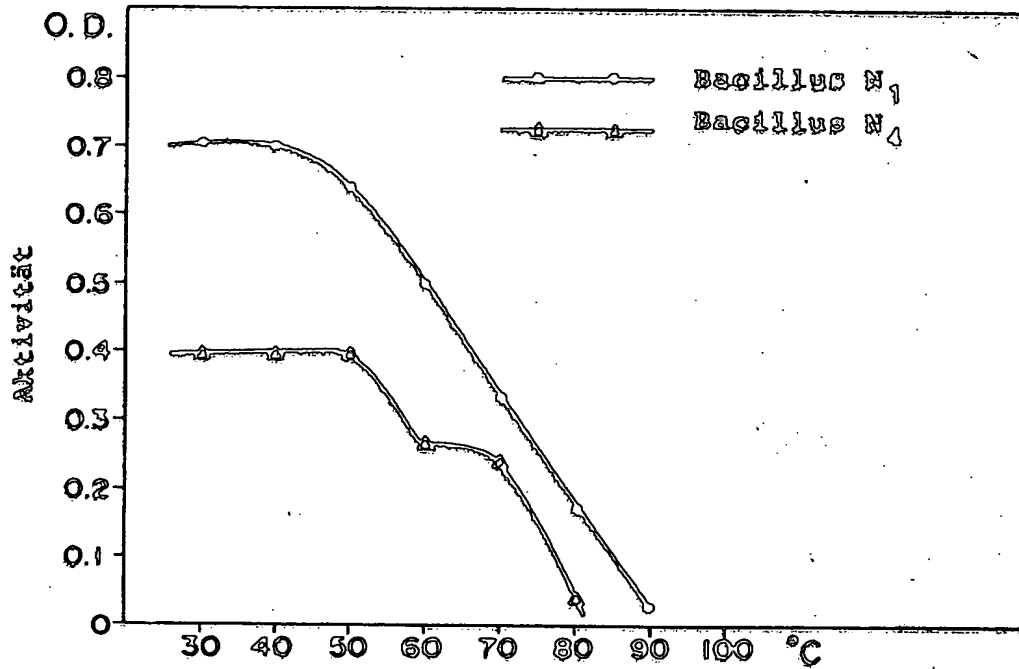


FIG. 8

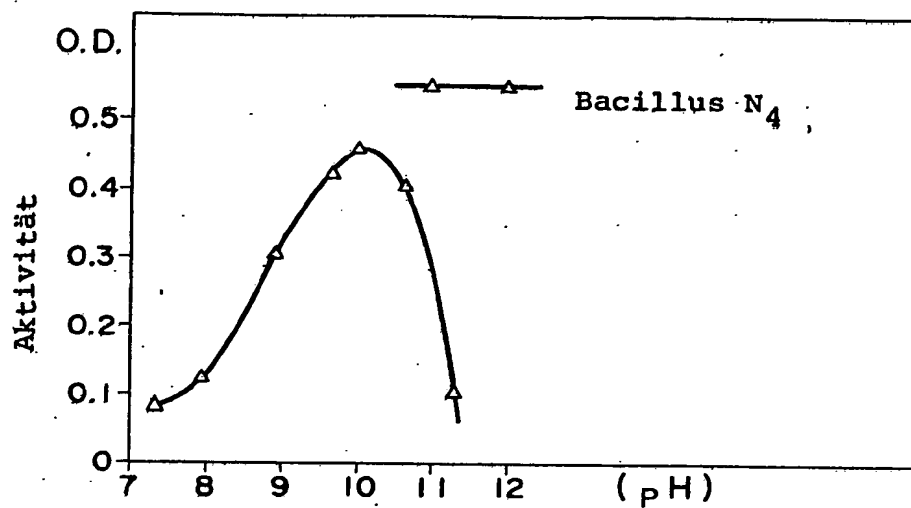


FIG. 5

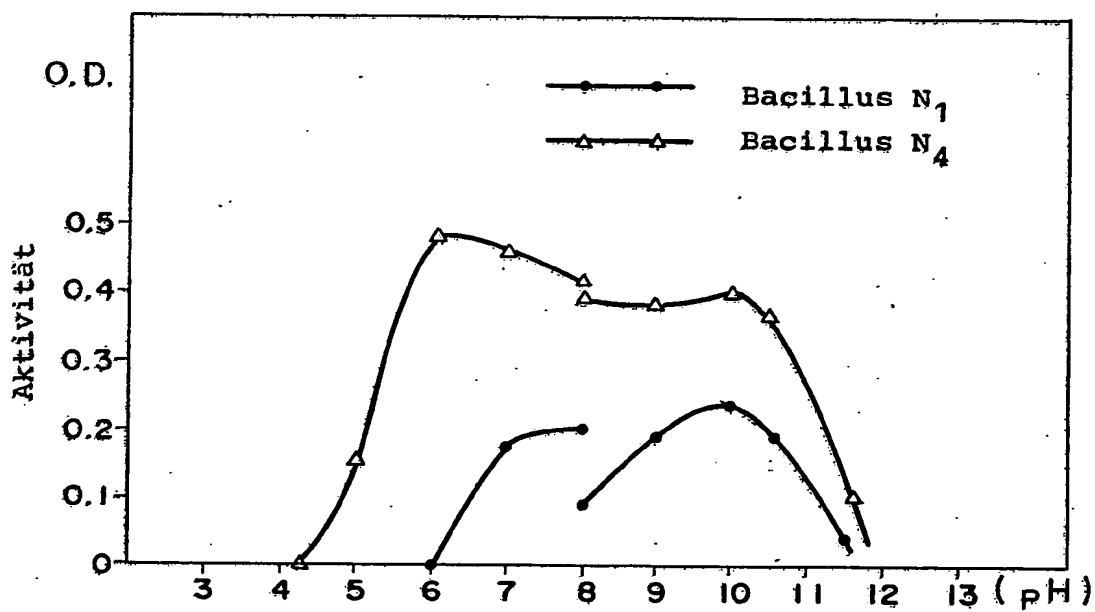


FIG. 6



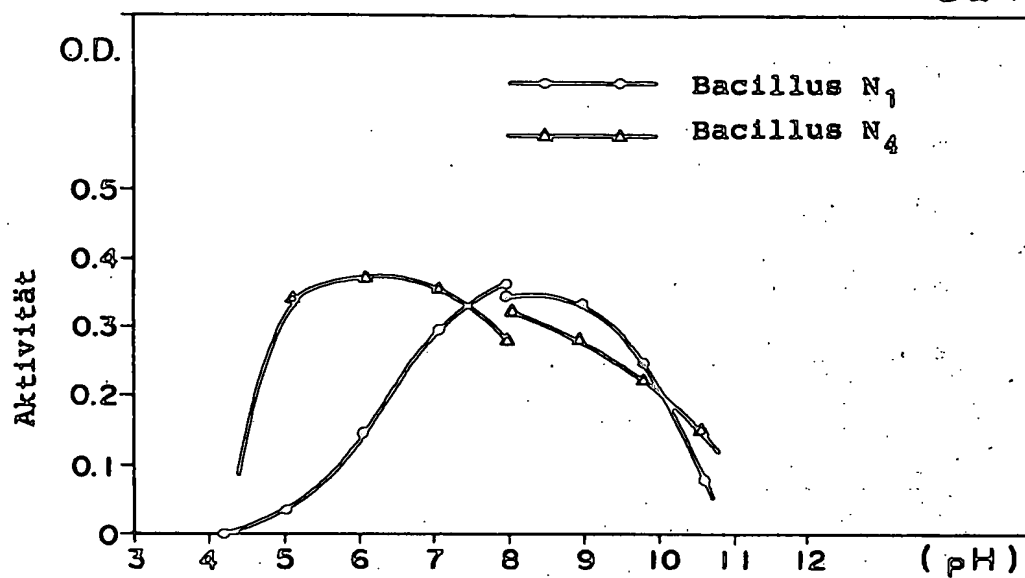


FIG. 3

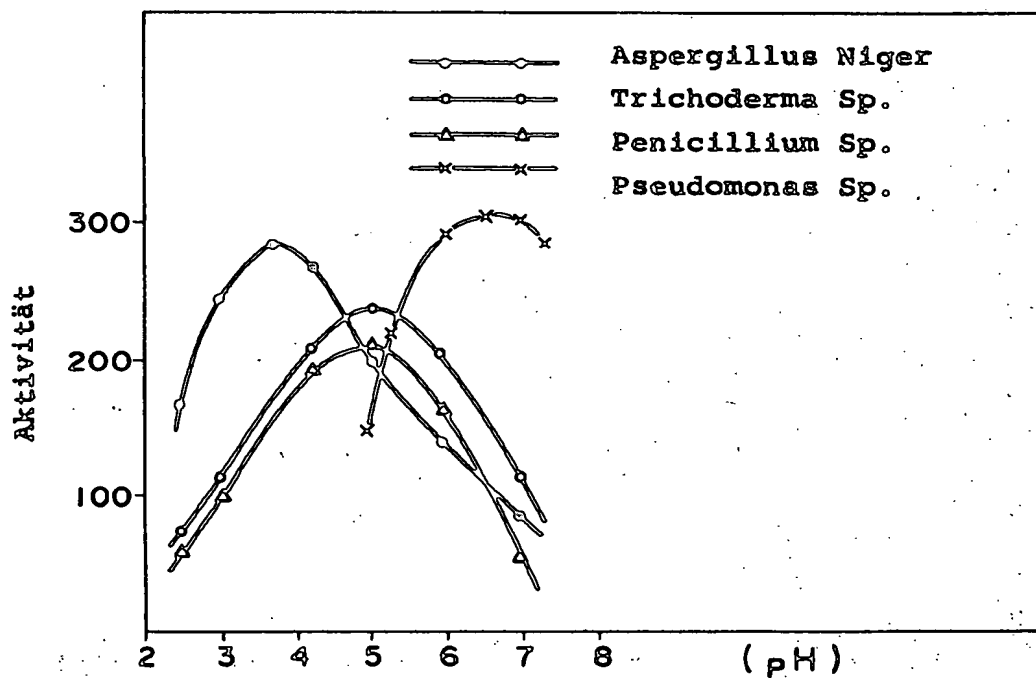


FIG. 4



Stamm Bacillus N<sub>1</sub>

FIG. 1



Stamm Bacillus N<sub>4</sub>

FIG! 2

6a 22-04 AT 29.09.72 OT 05.04.73

309814/1119